昆虫差异蛋白质组:进展和展望

刘凯于, 邱宝国, 洪华珠*, 彭建新
(华中师范大学昆虫学研究所/教育部农药与化学生物学重点实验室,武汉 430079)

摘要:黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori*、意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等昆虫的基因组测序已经基本完成,蛋白质组学技术将是阐明这些基因组功能的重要工具。本文综述了应用差异蛋白质组学技术在昆虫诱导性免疫、抗性机制和分子病理研究方面取得的一些成果:(1) 细菌、真菌、脂多糖或机械损伤诱导的昆虫血淋巴或血细胞来源细胞系的蛋白质表达的改变;(2) Bt 抗性昆虫中肠刷状缘膜和抗锥虫采采蝇 *Glossina morsitans* 唾液腺多种蛋白质表达的改变;(3)化学农药处理和姬蜂 *Chelonus inanitus* 携带的多分 DNA 病毒引起的昆虫蛋白质组的变化。最后讨论了昆虫差异蛋白质组学研究的瓶颈与对策。

关键词:昆虫;差异蛋白质组;免疫;抗性;病理
中图分类号:Q966 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2006)04-0680-07

Insect differential proteome: progress and prospects

LIU Kai-Yu, QIU Bao-Guo, HONG Hua-Zhu*, PENG Jian-Xin (Institute of Entomology/Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: With the completion of sequencing of the genomes of *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Apis mellifera*, *Anopheles gambiae*, *etc*., proteomic technology has been an important tool to clarify their functions. This article reviewed the achievements obtained by application of differential proteomic technology to the fields containing insect induced immunity, resistance mechanism and molecular pathology: (1) Changes in protein expression files in insect hemolymph and hemocyte cell line induced by bacteria, fungi or injecting; (2) Differential proteins in brush board membrane between Bt-resistant and susceptible insects or in salivary gland between resistant and susceptible sand fly to *Leishmania chagasi*; (3) Alteration in proteins between the insect treated by chemical pesticide or the hemolymph of insect induced by polydnavirus and control insect. Finally, the problems and strategies of insect differential proteomics have been discussed.

Key words: Insect; differential proteome; immunity; resistance; pathology

蛋白质组是指生物个体、组织或细胞表达的蛋白质分子总和,即一个基因组内所有基因表达的全部蛋白质。基因组是指生物体所含全套基因的总和。基因是稳定的,它决定蛋白质,但从基因到蛋白质要经过转录、mRNA 的剪切与拼接、翻译和翻译后修饰等一系列的复杂过程,因此一个基因可能编码数种蛋白质。蛋白质是变化的,不同生理条件下,蛋白质的表达谱系不同。蛋白质是生命活动执行的主体,要真正阐明基因的功能,必须深入到蛋白质组的研究,基因组、转录组和蛋白质组的研究是相互补充的。由于单种生物或细胞所表达的蛋白质种类一般都在数万种以上,而蛋白质的研究又远比基因的研究复杂,因此进行蛋白质组的研究将是一项需要众多实验室通力合作的艰巨而宏大的工程。比较特定因素处理或具有某些特征的生物体或组织细胞与对照组样品,发现它们绝大部分蛋白质的种类和数量是相似的,只有极少数蛋白质存在量和质的差异,这些差异蛋白质决定了生物体或细胞的特性,或者是不同的处理造成了这些蛋白质的差异。深入研究这些差异蛋白质既可以揭示生物体或细胞具有不同特

基金项目:国家自然科学基金项目(30571249)
作者简介:刘凯于,男,1968 年生,博士,讲师,主要从事昆虫分子生物学研究,E-mail:liukaiyu@mail.ccnu.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail:hzhong@mail.ccnu.edu.cn
收稿日期 Received:2005-10-20;接受日期 Accepted:2006-04-25

征的本质，又可以阐明不同处理的作用机制。差异蛋白质组（又称比较蛋白质组）是蛋白质组学研究的主要内容之一，其核心在于寻找某种特定因素引起的样本之间蛋白质组的差异，揭示并验证蛋白质组在生理或病理过程中的变化（孙言伟等，2005）。由于差异蛋白质种类较少，因此容易对其进行较深入的研究。目前，人类差异蛋白质组研究进展十分迅速，已经鉴定了许多具有重要生理功能和与重大疾病相关的蛋白质，带来了许多重大的理论突破，同时也给新药的开发带来了诱人的前景（钱小红和贺福初，2003）。

差异蛋白质组学与生物学的其他分支学科既存在区别，又相互联系。差异蛋白质组学以全部的差异蛋白作为研究对象，着重于研究差异蛋白的种类及其功能，揭示各种因素作用的分子机制，或差异蛋白与生物体生物学特性的相互关系。而生物学许多其他分支学科的研究不一定涉及差异蛋白质或全部差异蛋白质。但是差异蛋白质组学与生物学其他学科又是相互渗透，相互促进的，它已经成为了生命科学多个分支学科研究的重要手段。

差异蛋白质组学技术过程较复杂，一般包括多种样本蛋白质的分别提取与标记（如荧光染料标记），双向电泳，差异蛋白质分子量大小和等电点的估算，免疫印迹（有时采用），基质辅助激光解吸附飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）分析，测定部分肽段的氨基酸序列和 BLAST 检索（蛋白质的鉴定），以及数据的提交。深入的工作还应包括相应基因的克隆、表达及其功能的研究。如果实验室条件有限，可以不采用荧光染料标记，而同时采用多块胶平行进行双向电泳，电泳结束后对胶进行染色，然后采用相应的软件对差异蛋白质斑点进行量的比较、分子量大小和等电点估算。肽质量指纹图谱分析和微量测序等都可以由某些生物公司完成。目前差异蛋白质组的主要研究方法是 2-DE（二维凝胶电泳）分离和 MS（质谱）鉴定联合应用。

昆虫蛋白质组的研究正在兴起，目前主要集中于重要经济昆虫家蚕、模式生物果蝇、卫生害虫蚊虫和一些主要的农业害虫（Zdobnov *et al*.，2002；Giot *et al*.，2003）。应用差异蛋白质组学技术已经研究了昆虫的诱导性免疫、抗性机制和病理相关的蛋白质，鉴定了一系列新的免疫诱导蛋白、抗性相关蛋白和参与农药等作用的蛋白质，从差异蛋白质组水平较全面地展示了在免疫诱导、抗性形成和杀虫过程中昆虫体内蛋白质错综复杂的变化。

1　多层次的昆虫蛋白质组

目前，应用双向电泳、肽质量指纹图谱和 Edman 微量测序等技术已对一些昆虫的细胞及其某些亚细胞结构、卵壳、唾液腺和血淋巴等的蛋白质组进行了较深入的研究。

昆虫细胞系是许多昆虫生物学家进行科学研究的理想材料，它最便于进行蛋白质组的分析。粉纹夜蛾细胞系 TnH5 的总可溶性蛋白在一张 2D 胶上已显示出 760 多个蛋白质斑点，其膜蛋白已显示出了 260 多个蛋白质斑点（蒋才富等，2004；刘凯于等，2004）。Loseva 和 Engstrom（2004）报道家蚕 *Bombyx mori* 血细胞系 mbn-2 经脂多糖诱导后的可溶性蛋白可在一张 2D 胶上显示约 12 000 个蛋白质斑点。一些生物公司还专门生产了用于制备双向电泳细胞总蛋白和多种亚细胞结构蛋白的试剂盒。例如 Sigma 公司就研制了提取细胞膜蛋白、胞浆蛋白、细胞核蛋白和细胞骨架蛋白等的多种试剂盒，使用效果良好。这将极大地促进蛋白质在细胞亚结构中定位的研究。

昆虫的卵壳蛋白参与昆虫的胚胎发育，由于疏水性很强，难溶于水，既难以提取也难以转移到等电聚焦的固相 pH 梯度胶条（IPG 胶条）上，双向电泳图谱上蛋白质的斑点一直较少。Yao 和 Li（2003）改进了蚊虫卵壳蛋白的提取和双向电泳样品的制备方法，在 2D 胶上获得了分辨率良好的 700 多个蛋白质斑点。经胰蛋白酶胶内消化，应用 MALDI-TOF MS 分析和 BLAST 查询，对 38 个蛋白质斑点进行了初步鉴定。

多种蝇类都是人畜的病原生物传播的媒介，其唾液腺的分泌物关系到多种病原生物能否寄生成功，能否发育成具有感染性的个体，能否将其成功地传播给人畜，因此对该器官蛋白质组研究备受关注。Valenzuela 等（2004）对沙蝇 *Lutzomyia longipalpis* 唾液腺蛋白质（主要是分泌型蛋白质）进行了转录组和蛋白质组研究，已鉴定的蛋白质包括：1 种富含 RGD 的蛋白质、3 个黄色素相关蛋白、maxadilan（莨菪类药物）、类 PpSD15 蛋白、6 种似抗凝集素蛋白、1 种抗原Ⅴ相关蛋白、1 种类 D7 蛋白、1 种胞外基质蛋白、1 种 5′核酸酶、1 种肽酶、1 种棕榈酰水解酶、1 种核酸内切酶和 9 种新肽。还有 4 种蛋白质尚未找到同源蛋白。上述蛋白质中，16 种是沙蝇特有的。Ribeiro 等（2004）也从转录组和蛋白质组水平研究了雌库蚊

Culex pipiens quinquefasciatus 吸血后唾液腺的蛋白质变化，主要是一系列免疫相关蛋白，如 C 型凝集素、gambicin（一种抗菌肽）、前酚氧化酶级联反应（prophenoloxdase cascade）蛋白、CWRC 家族蛋白以及一些功能未知的蛋白。

昆虫虽然没有特异性免疫系统，但是却对多种病原物具有很强的抵抗能力，血淋巴是其重要的非特异性免疫器官，人们从来就没有停止过对这种免疫机制的探索，并希望从中找到一些广谱抗菌和抗病毒等的活性物质。Paskewitz 和 Li（2005）应用双向电泳技术显示了冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的去细胞血淋巴上清液的 280 个蛋白质斑点，结合微量测序和肽质量指纹图谱分析对其中的 28 个蛋白质斑点进行了鉴定，它们代表了 26 种蛋白质，这些蛋白质分别主要参与免疫、铁转运或脂类的生理代谢。其中 1 个 ML 家族成员是首次被发现，它参与脂类的识别。对于昆虫模式生物黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的血淋巴蛋白质组也已进行了较深入的研究。

家蚕是一种非常重要的经济昆虫，日本和我国学者对其蛋白质组开展了较深入的研究。钟伯雄等（2001，2003，2005）报道了家蚕多种组织器官蛋白质的提取方法，并建立了这些组织器官的部分数据库。目前已经初步建立了其胚胎发育各个时期的蛋白质组图谱，脂肪体、丝腺、雌性附腺、体壁和中肠的蛋白质组图谱，并对许多蛋白质斑点进行了测序或 MALDI-TOF MS 分析，鉴定了一些蛋白质的功能（钟伯雄，2001，2003，2005；Jin *et al*.，2004；吴卫成等，2005；颜新培等，2005）。

样品的质量对于双向电泳的分离效果有非常重要的影响。多种蛋白酶抑制剂的联合应用和采用新鲜的样品能显著提高蛋白质斑点的分辨率。即使添加有较高浓度的多种蛋白酶抑制剂，在 -20℃ 的条件下样品也会发生降解，膜蛋白的降解最明显。不同的银染方法对显示出的斑点数目有显著的影响，重铬酸钾媒染后的银染有较好的分辨率。采用正确的技术分离昆虫的组织器官，能减少操作时间，防止蛋白质的降解。例如，采用眼科镊夹住昆虫幼虫的头部和尾部，快速用力拉，能很快获得昆虫幼虫的中肠，在溶液中轻轻摆动，可使围食膜从肠腔滑出。取血淋巴也有技巧。对于体积较大而血淋巴又多的幼虫，可剪去第 2 对腹足使血淋巴流出，对于体积大而血淋巴少的昆虫（如蟑螂），可先将生理盐水注入体腔，然后再取血淋巴。在 SDS-PAGE 电泳时，当 IPG 胶条上的蛋白质转移到 SDS-PAGE 胶后，移去胶条能减轻胶块染色后的背景。总之，许多实验细节对 2-DE 和 MS 都有一定的影响，需要加以注意。

昆虫的亚细胞结构、细胞、组织或器官蛋白质组的研究成果使人们充分认识到昆虫结构组成与功能的一致性和复杂性，发现了一些具有重要生理功能的新蛋白质，为进一步开展差异蛋白质组的研究奠定了坚实的基础。

2 免疫诱导蛋白质组

昆虫依靠其非特异性免疫系统对多种病原微生物具有极强的抵抗力，研究昆虫免疫相关蛋白不仅可丰富人们对昆虫的认识，而且还具有巨大的潜在应用价值，特别是昆虫抗微生物多肽等有望产业化。用于昆虫免疫诱导的因子种类很多，包括物理因子、化学因子和生物因子。目前常用的主要是灭活的大肠杆菌或其细胞壁特定的化学成分，如肽聚糖和脂多糖等，此外真菌的葡聚糖也应用较广。目前的研究发现，血淋巴和脂肪体可产生丰富的免疫诱导蛋白，而昆虫幼虫的中肠不能产生免疫诱导蛋白（Wang *et al*.，2004），一些体外培养的细胞也可以产生免疫诱导蛋白（洪华珠和 Fallon，1999）。

Wang 等（2004）将大肠杆菌来源的脂多糖注入 5 龄家蚕的体内，采用双向电泳技术和肽质量指纹图谱检测诱导产生的多肽，结果发现脂肪体中的抗胰蛋白酶因子和血淋巴中的 Ⅱ 型丝氨酸蛋白酶抑制因子都上调表达。血淋巴中还诱导产生了新的 H2，H3 和 H4 蛋白，H4 为抗菌肽樗蚕素。注射脂多糖 48 h 后，诱导肽的量都开始下降。

Vierstraete 等（2004）采用荧光标记技术研究了果蝇在注射脂多糖后血淋巴中蛋白质的变化，结果表明，免疫后的血淋巴中，一些蛋白质上调表达。它们（如 Ⅱ 型含硫酯结构域蛋白等）或参与免疫应答反应，或参与应激反应等。此外，一种丝氨酸蛋白酶抑制因子介导活化有丝分裂蛋白激酶和 NF-κB 信号途径，还有许多免疫诱导蛋白与免疫应答无关。其中一些免疫诱导蛋白在注射脂多糖 48 h 后仍然在血淋巴中存在。Levy 等（2004）采用蛋白质组学技术研究了果蝇的系统性免疫应答，比较细菌或真菌感染的果蝇去血细胞血淋巴蛋白与非感染果蝇的去血细胞血淋巴蛋白，结果发现二者的二维胶上显示的 160 个蛋白质斑点中有 70 个斑点的差异量在 5 倍以上；这些参与免疫反应的蛋白有蛋白酶、蛋白

酶抑制因子、参与识别的分子、酚氧化活化酶、丝氨酸蛋白酶抑制因子和类革兰氏阴性菌结合蛋白。有些蛋白质在免疫过程中可能具有潜在的功能，如增味剂结合蛋白和转铁蛋白等；同时还发现真菌感染后有几种蛋白质分子部分水解而分子量减小。Loseva 和 Engstrom（2004）以果蝇血细胞系 mbn-2 为材料，研究了脂多糖对其的影响。采用双向电泳和质谱技术鉴定出了 24 种诱导前后存在差异的蛋白质，一些蛋白与免疫相关，如溶酶体蛋白酶、肌动蛋白结合蛋白及一些参与氧胁迫反应的蛋白，一些蛋白参与吞噬作用，另有一些蛋白参与钙离子信使系统和 mRNA 的加工。血液凝固是昆虫免疫的重要组成部分，其过程非常迅速。Karlsson 等（2004）的实验结果表明果蝇幼虫凝血后血淋巴中 CG8502（具粘蛋白型结构域，与角质层成分类似）、CG11313（与酚氧化酶活化酶具有同源性）、两种酚氧化酶、黄色素蛋白、分泌型凝溶胶蛋白以及 CG15825 的量下降，而一种铁转移蛋白亚基和两种类免疫球蛋白的量上升。这种变化可能是由于有些蛋白质参与了血凝块的组成从而降低了液态血淋巴中的含量。多个学者的比较蛋白质组研究工作都表明含硫酯结构域蛋白、β 葡聚糖结合蛋白、几种丝氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶抑制因子和一些代谢蛋白等都是果蝇血淋巴的免疫诱导蛋白（Engstrom *et al*.，2004）。

Paskewitz 和 Li（2005）报道细菌处理后的冈比亚按蚊的血淋巴中有三种已知蛋白显著上调表达，1 种是酚氧化酶，另两种是类几丁质酶。一些蛋白质则下调表达，包括转铁蛋白的轻链和重链。此外，注射细菌或受伤后血淋巴中还出现另外一些诱导蛋白，它们大部分是一些无信号肽的代谢酶。

Vierstraete 等（2004）报道低剂量的 Bt 毒素可诱导地中海螟 *Ephestia kuehniella*（Zeller）产生 10 多倍的抗性（不是由于抗性基因的选择），这种抗性可传递给下一代，同时昆虫的酚氧化酶活性增高，作者还推测昆虫中肠可能被诱导而分泌粘蛋白，具有分隔毒素的作用。此外，还有人报道家蚕核型多角体病毒感染的幼虫血淋巴具有抗病毒的作用（吴琼和洪华珠，2002）。

综上所述，免疫诱导后昆虫血淋巴蛋白质组的变化具有一定的规律。血淋巴中酚氧化酶及其活化酶、蛋白水解酶（溶酶体水解酶）、溶菌酶、抗菌肽、丝氨酸蛋白酶、一些蛋白酶抑制因子（antitripsin，serpin）、几丁质酶、类免疫球蛋白、粘蛋白，一些代谢酶和信号转导蛋白等都上调表达。参与昆虫非特异性免疫的蛋白质种类很多，随着研究的深入，将会发现更多的免疫诱导蛋白。

3　抗性相关蛋白质组

目前，昆虫对 Bt 毒素和化学农药等的抗性以及采采蝇 *Glossina morsitans* 对锥虫 *Leishmania chagasi* 等的抗性是国内外研究的热点之一，相应的抗性相关蛋白质组的研究也取得了一些成果，一些杀虫剂新的作用靶标分子被鉴定出来，生理抗性的机制研究取得了较大的进展。

锥虫寄生于采采蝇的中肠腔内，其中肠蛋白分子影响锥虫能否在宿主昆虫体内寄生和分化发育成对哺乳动物具有感染性的虫态，这种蝇在非洲锥虫的生活史中具有重要的作用。Haddow 等（2005）研究了对锥虫敏感性不同的两个采采蝇品系中肠的蛋白质，共鉴定了 207 种蛋白质，在对锥虫敏感的品系中肠中有 17 种蛋白质上调表达，9 种下调表达。上调表达的蛋白质中，有些也分布于该昆虫的唾液腺，其中 1 种蛋白质 EP 具有凝集素样活性，细菌处理也能诱导其上调表达，它可能介导锥虫的寄生。

昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜是 Bt 杀虫晶体蛋白毒素作用的靶标，昆虫 Bt 抗性的产生与其直接相关。McNall 和 Adang（2003）采用双向电泳结合免疫印迹等技术从烟草天蛾 *Manduca sexta* 刷状缘膜囊上鉴定出肌动蛋白、氨肽酶 N 和碱性磷酸酶为 Cry1Ac 毒素的结合蛋白。Jurat-Fuentes 和 Adang（2004）报道碱性磷酸酶量的减少可能与 Cry1Ac 抗性的产生相关。Candas 等（2003）研究了 Bt 抗性与敏感印度谷螟 *Plodia interpunctella* 中肠蛋白，结果表明抗性昆虫中有一系列增强谷胱甘肽利用和提高氧化代谢的蛋白质（GSH 转移酶、细胞色素 C 氧化酶亚基 Ⅰ 和 NADH 脱氢酶亚基 Ⅴ）上调表达；维持能量平衡的蛋白质（F1F0-ATPase）也存在差异，抗性昆虫 F1F0-ATPase 分子量比敏感昆虫的小；抗性昆虫的类胰蛋白酶的量显著减少，这降低了对 Bt 毒素的活化，与抗性的产生直接相关。氧化代谢增强是昆虫对 Bt 的一种适应性反应，有利于其渡过生死攸关的时期，参与解毒作用，提高发生与抗性相关和有利于抗性昆虫生存的基因突变的频率。Cry1Ac 毒素筛选的抗性粉纹夜蛾细胞 TnH5 与未经选择的细胞相比，总蛋白和膜蛋白中一些蛋白质的表达也都具有明显的差异（蒋才富等，2004；刘凯于等，2004）。化学农药抗性昆虫一般是 GSH 转移酶的活性增高，

同时往往伴随有羧酸酯酶和细胞色素 P450 活性的升高。

上述研究结果表明，昆虫抗性的产生是昆虫不断适应环境而改变生理和抗性基因选择的综合结果，它往往涉及到一系列的蛋白质的相互作用。例如，低剂量的 Bt 毒素可诱导地中海螟产生 10 多倍的抗性，这显然主要是诱导产生的生理抗性。一个 Cry1Ac 抗性烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 品系的钙粘蛋白基因的突变决定 40% ~ 80% 抗性，显然这主要是抗性基因选择的结果。由于蛋白质的相互作用非常复杂，采用蛋白质组技术研究抗性的机制将是一种较好的方法，它有利于从蛋白质错综复杂的相互关系之中探索抗性的复杂机制。

4 毒理或病理相关蛋白质组

蛋白质组技术的诞生使昆虫分子病理的研究有望取得大的突破，使人们能够从细胞、组织、器官或虫体蛋白质组的变化来深入了解杀虫剂或病原物的作用机理。

Sharma 等（2004）报道杀虫剂丁基灭必虱（o-sec-butylphenyl methylcarbamate compound，BPMC）处理的褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 与对照组相比，有 22 种蛋白质的表达发生了改变。其中 10 种上调表达，8 种下调表达，4 种特异性表达。其中丝氨酸或苏氨酸蛋白激酶、副肌球蛋白、HSP90、β-微管蛋白亚基、钙网蛋白、ATP 合成酶、肌动蛋白、原肌球蛋白都上调表达，肽酶（β mitochondrial processing peptidase，MPP）、二氢硫辛酰胺脱氢酶（dihydrolipoamide dehydrogenase）、烯醇化酶和乙酰辅酶 A 脱氢酶都下调表达。这些结果表明 BPMC 杀虫剂的处理使褐飞虱细胞的结构和代谢发生了变化。

Kaeslin 等（2005）报道在姬蜂 *Chelonus inanitus* 携带的多分 DNA 病毒诱导斜纹夜蛾的血淋巴中有 11 种蛋白质表达下调，并有寄生姬蜂释放的 5 种蛋白质。这些蛋白质表达的变化可阻止斜纹夜蛾的成虫前期变态和化蛹。

Jin 等（2004）还报道采用差异蛋白质组技术分析了卵粒呈散状（突变品系）和呈块状的两种家蚕品系附腺的蛋白质组，结果发现卵粒成散状的家蚕附腺中缺失肌动蛋白。

总之，虽然杀虫剂作用靶标的研究已经深入到分子水平，但昆虫毒理或病理相关蛋白质组的研究进展缓慢，农药等如何引起昆虫蛋白质组的变化以及这些差异蛋白质分子之间的相互关系将是今后昆虫毒理学研究的重点之一。

此外，差异蛋白质组学技术在昆虫学其他众多领域也得到了广泛的应用。李凯等（2005）报道了其在法医昆虫学领域的一些应用。该技术在昆虫发育生物学领域也得到了广泛的应用。

5 问题与展望

目前，昆虫蛋白质组研究还面临着一系列的问题。有些是整个蛋白质组技术平台需要解决的，有些则具有特殊性。首先，单种细胞内表达的蛋白质估计约有 10 000 种左右，而目前通过 2-DE 只能显示出较高丰度的 1 000 多种，即使采取亚细胞蛋白质组技术，显示的蛋白质斑点的数目也离 10 000 相差甚远。即使能够显示出来，一些低丰度蛋白质的量也难以满足质谱分析和测序工作的需要。第二，目前除人类、小鼠、大肠杆菌和果蝇等模式生物的蛋白质数据库较完善外，许多物种的蛋白质数据库还是一片空白，并且同一个属的不同种，甚至同一种的不同品系的同一种蛋白质的肽质量指纹图谱也可能相差甚远，无法比对，这给蛋白质的鉴定工作带来了许多困难。第三，还有待进一步阐明差异蛋白质之间的相互作用。以上这些都是蛋白质组研究过程中经常遇到的问题。对于昆虫，还存在另外一些特殊情况。体壁、围食膜和卵壳的蛋白质难以充分提取。昆虫在发育过程中存在变态现象，这大大增加了其蛋白质数据库建立的工作量。昆虫种类极多，难以建立包含众多种类昆虫的蛋白质数据库。资金投入不足也是限制其发展的主要因素之一。

对于上述问题已经逐步有了一些解决的方法。除了 2-DE 技术外，其他几种技术手段，如多维液相色谱分离技术、ICAT 技术、蛋白质芯片技术等差异蛋白质组学研究技术都可以作为 2-DE 技术的补充，甚至替代技术（孙言伟等，2005）。采用荧光标记技术显示的蛋白质斑点数比银染显示的蛋白质斑点数大大增多了。特别是 2-D DIGE 荧光差异蛋白表达系统，结合了多重荧光分析的方法，在同一块胶上共同分离多个分别由不同荧光标记的蛋白样品，并引入了内标，极大地提高了分析结果的准确性、可靠性和重复性。设定较宽的条件，将肽质量指纹的数据输入数据库进行查询，将有利于对蛋白质进行初步鉴定。采用微量测序法将蛋白质进行部分测序，然后在多个数据库进行查询，也将大大提高蛋白质鉴

定的成功率。从差异蛋白质返回到差异表达基因，应用酵母双杂交系统分析差异蛋白质间相互作用，界定相互作用的连锁群。总之，随着昆虫蛋白质组研究的不断进步，人们对昆虫的认识将不断加深，更多的昆虫资源物质将被发现，昆虫将更好地为人类健康、饮食和文化等造福。

参 考 文 献（References）

Candas M，Loseva O，Oppert B，Kosaraju P，Bulla LA，2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*：Alteration in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*，2：19－28.

Engstrom Y，Loseva O，Theopold U，2004. Proteomics of the *Drosophila* immune response. *Trends Biotechnol.*，22：600－605.

Giot L，Bader JS，Brouwer C，*et al.*，2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*，302（5 651）：1 727－1 736.

Haddow JD，Haines LR，Gooding RH，Olafson RW，Pearson TW，2005. Identification of midgut proteins that are differentially expressed in trypanosome-susceptible and normal tsetse flies（*Glossina morsitans morsitans*）. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，35(5)：425－433.

Hong HZ，Fallon AM，1999. Preliminary studies on induction and detection of antibacterial activity selected by cultured *Trichoplusia ni*（Lepidoptera：Noctuidae）cells. *Journal of Central China Normal University*（*Natural Sciences*），33（4）：564－569.［洪华珠，Fallon AM，1999. 粉纹夜蛾离体细胞抗菌肽的诱导和抗菌活性的测定. 华中师范大学学报(自然科学版)，33(4)：564－569］

Jiang CF，Liu KY，Peng R，Zheng J，Peng JX，Hong HZ，2004. Differential proteomic analysis of Bt Cry1Ac toxin-resistant and susceptible BTI-TN-5B1-4 cells. *Acta Entomologica Sinica*，47（4）：686－690.［蒋才富，刘凯于，彭蓉，郑进，彭建新，洪华珠，2004. Bt Cry1Ac 毒素筛选的粉纹夜蛾离体抗性细胞与敏感细胞蛋白质组的差异分析. 昆虫学报，47(4)：686－690］

Jin Y，Xu M，Chen Y，2004. Studies on the proteome colleterial gland and its Ng mutant of silkworm（*Bombyx mori*）using two dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Pro. Biochem. Biophys.*，31(7)：622－627.

Jurat-Fuentes JL，Adang MJ，2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.*，271：3 127－3 135.

Kaeslin M，Pfister-Wilhelm R，Molina D，Lanzrein B，2005. Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polydnavirus and physiological implication. *J. Insect Physiol.*，51(9)：975－978.

Karlsson C，Korayem AM，Scherfer C，Loseva O，Dushay MS，Theopold U，2004. Proteomic analysis of *Drosophila* larval hemolymph. *J. Biol. Chem.*，279(50)：52 033－52 041.

Levy F，Bulet P，Ehret-Saabatier L，2004. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol. Cell. Proteomics*，3：156－166.

Li K，Ye GY，Hu C，2005. Identification of early larvae of common carrion-breeding flies by two-dimensional gel electrophoresis finger map. *Acta Entomologica Sinica*，48（4）：576－581.［李凯，叶恭银，胡萃，2005. 双向凝胶电泳图谱用于常见尸食性蝇类初孵幼虫的鉴别. 昆虫学报，48（4）：576－581］

Liu KY，Yang H，Jiang CF，Peng JX，Hong HZ，2004. Characterization of *Trichoplusia ni* cell line selected by Bt Cry1Ac. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*，37(3)：205－211.［刘凯于，杨红，蒋才富，彭建新，洪华珠，2004. 抗苏云金杆菌 Cry1Ac 毒素粉纹夜蛾细胞系的特性研究. 实验生物学报，37(3)：205－211］

Loseva O，Engstrom Y，2004. Analysis of signal-dependent changes in the proteome of *Drosophila* blood cells during an immune response. *Mol. Cell. Proteomics*，3：796－808.

McNall RJ，Adang MJ，2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，33(10)：999－1 010.

Paskewitz SM，Shi L，2005. The hemolymph proteome of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，35(8)：815－824.

Qian XH，He FC，2003. Proteomics：Theory and Methods. Beijing：Science Press.［钱小红，贺福初，2003. 蛋白质组学：理论与方法. 北京：科学出版社］

Ribeiro JM，Charlab R，Pham VM，Garfield M，Valenzuela JG，2004. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，34(6)：543－563.

Sharma R，Komotsu S，Noda H，2004. Proteomic analysis of brown planthopper：Application to the study of carbamate toxicity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，34(5)：425－432.

Sun YW，Jiang Y，He FC，2005. Advance in differential proteomics research. *Chinese Bulletin of Life Science*，17(2)：137－140.［孙言伟，姜颖，贺福初，2005. 差异蛋白质组学的研究进展. 生命科学，17(2)：137－140］

Valenzuela JG，Garfield M，Rowton ED，Pham VM，2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*，vector of *Leishmania chagasi*. *J. Exp. Biol.*，207：3 717－3 729.

Vierstraete E，Verleyen P，Baggerman G，Hertog WD，Bergh GV，Arckens L，Loof AD，Schoofs L，2004. A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *PNAS*，101(2)：470－475.

Wang YQ，Zhang PB，Fujii H，*et al.*，2004. Proteomic studies of lipolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm，*Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*，68(8)：1 821－1 823.

Wu Q，Hong HZ，2003. Induction and identification of viral inhibitory factors against baculovirus. *Chinese Journal of Virology*，19(2)：164－168.［吴琼，洪华珠，2003. 昆虫抗杆状病毒活性物质的诱导. 病毒学报，19(2)：164－168］

Wu WC，Zhong BX，Meng ZQ，Cheng JE，Yan XP，Ye J，Shen FY，2005. Composition analysis of protein from posterior silk gland of silkworm *Bombyx mori* between larvae of 4th molting stage and the 5th instar stage. *Acta Sericologica Sinica*，31(3)：269－273.［吴卫成，钟伯雄，孟智启，陈金娥，颜新培，叶键，沈飞英，2005. 家蚕 4 眠期和 5 龄期后部丝腺细胞蛋白质组成分析. 蚕业科学，31(3)：269－273］

Yan XP，Zhong BX，Xu MK，Liang JS，Shen FY，2005. Analysis of protein

patterns from embryo of silkworm *Bombyx mori* at early stages by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Entomologica Sinica*, 48(2):295 – 300. [**颜新培,钟伯雄,徐孟奎,梁建设,沈飞英**, 2005. **家蚕催青前期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析. 昆虫学报**, 48(2):295 – 300]

Yao R, Li J, 2003. Towards global analysis of mosquito chorion proteins through sequential extraction, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 3(10):2 036 – 2 043.

Zdobnov EM, Mering C, Letunic I, *et al*., 2002. Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science*, 298:149 – 159.

Zhong BX, 2001. Protein databank for several tissues derived from five instar of silkworm. *Acta Genetica Sinica*, 28(3):217 – 224. [**钟伯雄**, 2001. **五龄家蚕若干组织器官蛋白质数据库的构建. 遗传学报**, 28(3):217 – 224]

Zhong BX, Chen JE, Yan XP, Xu MK, Liang JS, 2005. Analysis of protein patterns from embryo of silkworm *Bombyx mori* at later stages by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Entomologica Sinica*, 48(4):637 – 642. [**钟伯雄, 陈金娥,颜新培, 徐孟奎,梁建设**, 2005. **家蚕催青后期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析. 昆虫学报**,48(4):637 – 642]

Zhong BX, Yan HY, Shen FY, Li JK, Zhou L, 2003. Preparation of silkworm protein using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Sericologica Sinica*, 29(4):427 – 432. [**钟伯雄,颜海燕,沈飞英, 李建科,周丽**, 2003. **家蚕双向电泳样品的制备方法. 蚕业科学**, 29(4):427 – 432]

(责任编辑:黄玲巧)